

ISSN: 1988-2688

<http://www.ucm.es/BUCM/revistasBUC/portal/modulos.php?name=Revistas2&id=RCCV&col=1><http://dx.doi.org/10.5209/RCCV.55687>*Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 2017 11(especial):283-289*

**EL SURFACTANTE PULMONAR DISMINUYE LA INVASIÓN DE NEUMOCITOS  
POR EL PATÓGENO RESPIRATORIO *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* NO  
TIPIFICABLE.**

**LUNG SURFACTANT DIMINISHES NON-TYPEABLE *HAEMOPHILUS  
INFLUENZAE* INVASION OF PNEUMOCYTES.**

**González Carnicero, Z.**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. Facultad de Ciencias Biológicas. UCM.

Correspondencia del autor: [zoe.2402@gmail.com](mailto:zoe.2402@gmail.com)

**RESUMEN**

El surfactante pulmonar es un complejo lipoproteico que recubre los alveolos siendo la primera barrera defensiva ante patógenos respiratorios. El patógeno *Haemophylus influenzae* no tipificable (NTHi) provoca infecciones persistentes en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) debido a su capacidad de internarse y sobrevivir en neumocitos. Nuestro objetivo ha sido caracterizar el papel del componente lipídico del surfactante +/- las proteínas SP-B y SP-C, en la invasión y adhesión de NTHi a neumocitos.

Hemos demostrado que vesículas multilamelares de surfactante interfirieron en la internación de NTHi en neumocitos, debido al menos en parte a que disminuyeron la adhesión de la bacteria. Por otro lado, vesículas unilamelares de surfactante, al ser endocitadas por los neumocitos, inhibieron la invasión de NTHi, aunque sólo la presencia de SP-B y SP-C disminuyó su adhesión. Los resultados mostraron que los lípidos y las proteínas SP-B y SP-C del surfactante inhibieron la capacidad de NTHi de invadir el epitelio alveolar por diversos mecanismos.

**Palabras clave:** surfactante pulmonar, *Haemophilus influenzae* no tipificable, neumocitos, pulmón.

## ABSTRACT

Lung surfactant is a lipoprotein complex that lines the alveolar fluid and is the first barrier against respiratory pathogens. The pathogen non typeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) causes persistent infections in patients of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) due to its ability to be internalized and survive in pneumocytes. Our objective was to characterize the effect of the lipid component of pulmonary surfactant, with or without surfactant proteins SP-B and SP-C, in the invasion and adhesion of NTHi to pneumocytes.

We found that multilamellar vesicles of surfactant, inhibited invasion of pneumocytes by NTHi, due at least in part to lower adhesion to epithelial cells. Moreover, unilamellar vesicles surfactant, that are endocytosed by pneumocytes, inhibited internalization of NTHi, but only the presence of SP-B and SP-C reduced adhesion of NTHi to epithelial cells. Our results show that surfactant lipids and SP-B and SP-C inhibit NTHi invasion of pneumocytes through various mechanisms.

Key words: pulmonary surfactant, non typeable *Haemophilus influenzae*, pneumocytes, lung.

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El surfactante pulmonar es un complejo lipoproteico esencial para reducir la tensión superficial en la interfase aire-líquido del fluido alveolar, lo que evita el colapso alveolar al final de la espiración [Casals y Cañadas (2012)]. El surfactante pulmonar está compuesto por un 90 % en peso de lípidos y un 10 % en peso de proteínas, de las cuales las proteínas específicas del surfactante pulmonar son: SP-A, SP-B, SP-C y SP-D. La participación de SP-A y SP-D en la defensa inmune de los alveolos está bien caracterizada [Chroneos *et al.* (2010)]. Sin embargo, el papel de las proteínas SP-B y SP-C, así como de los lípidos del surfactante pulmonar en la defensa ante la infección no ha sido suficientemente explorado [Chroneos *et al.* (2010)].

*Haemophilus influenzae* no tipificable (NTHi) es un cocobacilo Gram negativo no capsulado que coloniza la nasofaringe humana de individuos sanos. Sin embargo en individuos inmunocomprometidos o en pacientes de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es capaz de infectar las vías respiratorias de forma persistente [Murphy *et al.* (2004)]. Uno de los mecanismos a través de los que NTHi podría producir infecciones recurrentes es su

capacidad de internarse y sobrevivir en los neumocitos evadiendo la respuesta inmune [Morey *et al.* (2011)].

Nuestra **hipótesis** es que el componente lipídico del surfactante pulmonar y/o las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C protegen frente a la infección por NTHi. Nuestro **objetivo** en este trabajo ha sido caracterizar el efecto del componente lipídico del surfactante, conteniendo o no las proteínas SP-B y SP-C en la invasión y adhesión de NTHi a neumocitos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de vesículas de surfactante: El componente lipídico del surfactante acompañado de las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C (PS) fue extraído con cloroformo/metanol, a partir de surfactante aislado de lavados broncoalveolares de rata. Adicionalmente, se utilizó una mezcla de lípidos sintéticos del surfactante pulmonar (PL) (dipalmitoilfosfatidilcolina / 1-palmitoil-2-oleil-fosfatidilglicerol / ácido palmítico, 2,3:1:0,16 w/w). Las vesículas se prepararon mediante hidratación a una temperatura por encima de la temperatura de transición de fase de la mezcla, con el fin de obtener vesículas multilamelares (MLVs) ( $> 1 \mu\text{m}$ ). A partir de las MLVs por sonicación se obtuvieron vesículas unilamelares pequeñas (SUVs, de 70 nm) en el caso de PL, y vesículas unilamelares grandes (LUVs, de 325 nm) en el caso de PS.

Experimentos de adhesión de NTHi a neumocitos: Los neumocitos de ratón, MLE-12, se infectaron durante 30 minutos con NTHi  $10^8$  u.f.c./mL en medio Hank's. Después, se lavó con buffer fosfato salino (PBS) para eliminar las bacterias no adheridas y se lisaron los neumocitos con saponina 0,05%. Los lisados se sembraron en placas de agar para contabilizar al día siguiente el número de unidades formadoras de colonias (u.f.c.).

Experimentos de invasión de NTHi en neumocitos: Para permitir la internación de la bacteria en las células MLE-12, éstas se infectaron durante 2h, tras las que se lavó con PBS y se incubó 1h en medio con gentamicina 200  $\mu\text{g/mL}$  para eliminar las bacterias extracelulares y se lisaron las MLE-12 con saponina 0,05%, para sembrar en placas y contabilizar el número de u.f.c.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, hemos determinado que la coincubación de MLVs de PL o de PS con NTHi (aislado clínico de EPOC) durante la infección de neumocitos, disminuyeron significativamente la invasión de NTHi en las células MLE-12, de forma dosis-dependiente

(Figura 1). No se observaron diferencias significativas entre el efecto de MLVs de PL y de PS en la internación de NTHi, excepto a la menor dosis empleada (50  $\mu\text{g/mL}$ ), a la que se observó mayor inhibición de la invasión con MLVs de PS.

Con el fin de determinar si la disminución de la invasión observada se debe a que las MLVs interfieren con la adhesión de la bacteria al neumocito, realizamos experimentos de adhesión. La figura 2 muestra que la coincubación de MLVs de PL o PS con NTHi durante la infección, disminuyó la adhesión de la bacteria a las células MLE-12. No se observaron diferencias significativas entre el efecto de MLVs de PL y de PS. La inhibición de la adhesión fue menor que la inhibición detectada en los experimentos de invasión (Figura 1), lo que indica que sólo parte de la inhibición de la invasión se debe a que las MLVs de surfactante interfieren con la adhesión.

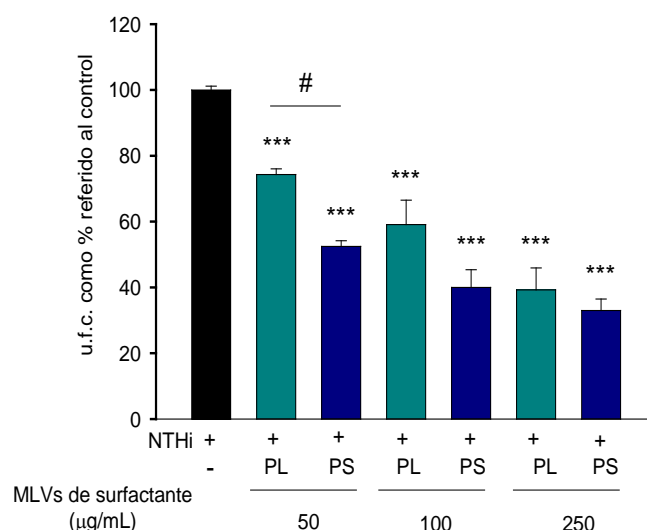


Figura 1: La coincubación de MLVs de PL o PS con NTHi durante la infección disminuyó la internación de la bacteria. Los datos se presentan en % respecto al número de u.f.c. del control (neumocitos infectados en ausencia de surfactante). Se trata de tres experimentos independientes, hechos por duplicado. (\*\*\*)  $p < 0.001$  vs. Control y (#)  $p < 0.05$  entre los tratamientos indicados.

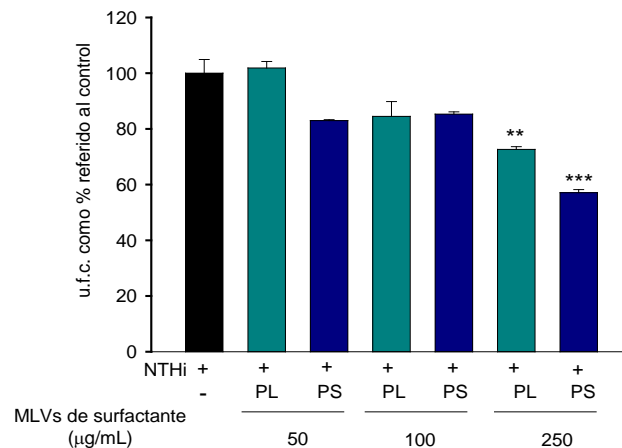


Figura 2: La coincubación de MLVs de PL o PS con NTHi durante la infección disminuyó la adhesión de la bacteria a neumocitos. Los datos se presentan en % respecto al número de bacterias adheridas a la superficie de las células (u.f.c.) del control (neumocitos infectados en ausencia de surfactante). Se trata de tres experimentos independientes, hechos por duplicado. (\*\*\*)  $p < 0.001$  vs. Control.

A diferencia de las MLVs de surfactante ( $>1 \mu\text{m}$ ) que no son endocitadas, SUVs de PL (70 nm) y LUVs de PS (325 nm) son endocitadas por los neumocitos, como se demostró por microscopía confocal con vesículas marcadas con fluorescencia (datos no mostrados). Por tanto, a continuación analizamos el efecto intracelular de SUVs de PL y de LUVs de PS preincubadas durante 24h con las células MLE-12, en la adhesión y la invasión de NTHi. Como muestra la figura 3, los PL actuaron intracelularmente inhibiendo la invasión pero no la adhesión de la bacteria, sin embargo PS inhibió tanto la adhesión como la invasión de NTHi. Estos resultados indican que a nivel intracelular los lípidos del surfactante (PL) actúan inhibiendo solo la invasión, sin embargo la presencia de las proteínas SP-C y SP-B y otros lípidos del surfactante afecta también a la adhesión de la bacteria al neumocito. Desconocemos el mecanismo por el que esto ocurre, pero probablemente se deba a una disminución en la expresión de receptores del neumocito que reconocen NTHi, lo que vamos a estudiar de ahora en adelante.

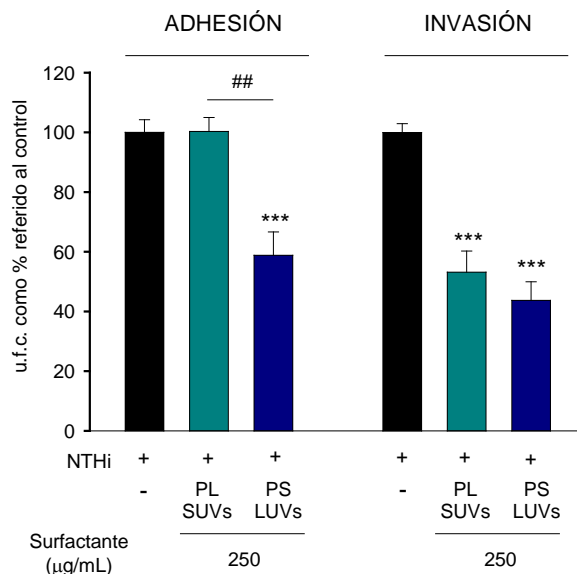


Figura 3. Los PL actúan intracelularmente inhibiendo la invasión pero no la adhesión de NTHi al neumocito, mientras que PS inhibe tanto la adhesión como la internación de la bacteria en los neumocitos. Los datos se presentan en % respecto al número de u.f.c. del control (ausencia de surfactante). Se trata de dos experimentos independientes, hechos por duplicado. (\*\*\*)  $p < 0.001$  vs. Control y (##)  $p < 0.01$  entre los tratamientos indicados.

## CONCLUSIONES.

1. Las vesículas multilamelares de PL o de PS inhibieron la invasión de NTHi en las células MLE-12. Esta inhibición se debe, al menos en parte, a la interferencia de las MLVs en el medio extracelular con la adhesión de la bacteria a los neumocitos.
2. Las vesículas unilamelares de PL o PS al ser endocitadas por los neumocitos tienen efectos diferentes sobre la invasión y la adhesión de NTHi. Los PLs inhiben la invasión pero no la adhesión de NTHi al neumocito, sin embargo la presencia de las proteínas SP-B y SP-C y otros lípidos del surfactante provoca una disminución tanto en la adhesión como en la invasión de la bacteria al neumocito.

## BIBLIOGRAFÍA

- Casals C y Cañadas O. 2012 *Role of lipid ordered/disordered phase coexistence in pulmonary surfactant function*. **BBA-Biomembranes** 1818: 2550-2562, doi: 10.1016/j.bbamem.2012.05.024.
- Chronos ZC, Sever-Chroneos Z. 2010 *Pulmonary surfactant: an immunological perspective*. *Cell Physiol Biochem*. 25(1):13-26. doi: 10.1159/000272047.

- Morey A, Cano V, Martí-Lliteras P, López-Gómez A, Regueiro V, Saus C, Bengoechea JA, Garmendia J. 2011 *Evidence for a non-replicative intracellular stage of nontypeable Haemophilus influenzae in epithelial cells*. Microbiology 157: 234-250, doi: 10.1099/mic.0.040451-0.
- Murphy TF, Brauer AL, Schiffmacher AT, Sethi S. 2004 *Persistent Colonization by Haemophilus influenzae in Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Am J Respir Crit Care Med. 170: 266–272.